



DIPARTIMENTO DI MEDICINA CLINICA E SPERIMENTALE

Corso di Laurea in Medicina e Chirurgia

"Impiego degli innesti cutanei nel Pioderma Gangrenoso"

RELATORE

Prof. Marco Romanelli

CANDIDATA

Virginia Franchini

ANNO ACCADEMICO 2014/2015

INDICE

1. INTRODUZIONE

1.1a Pioderma Gangrenoso: Definizione ed eziopatogenesi	2
1.1b Pioderma Gangrenoso: Clinica e varianti	6
1.1c Pioderma Gangrenoso: Comorbilità	12
1.1d Pioderma Gangrenoso: Diagnosi e differenziali	14
1.1e Pioderma Gangrenoso: Terapia	18
1.2 Wound Bed Preparation	22
1.3 Innesti cutanei	27
1.4 Innesto epidermico frazionale	35

2. MATERIALI E METODI

2.1 Innesti nel Pioderma Gangrenoso: Esperienza della U.O Dermatologia dell'Università di Pisa	37
---	----

3. DISCUSSIONE

46

4. CONCLUSIONI.....

53

BIBLIOGRAFIA.....

55

INTRODUZIONE

1.1a Pioderma Gangrenoso: DEFINIZIONE ED EZIOPATOGENESI

Il Pioderma Gangrenoso è una rara dermatosi neutrofilica della cute e delle mucose, che evolve spesso in ulcere dolorose spontanee o post-traumatiche. E' stato stimato che i pazienti affetti hanno un rischio di mortalità tre volte superiore alla popolazione generale, dovuto alle innumerevoli comorbidità.¹

Il PG (Pioderma Gangrenoso) ha un notevole impatto sulla qualità di vita di questi pazienti a causa del dolore, del cattivo odore e dell'essudato che possono provocare ansia, depressione ed isolamento sociale.²

La sua incidenza è compresa tra 3 e 10 casi su un milione di abitanti all'anno, anche se il reale valore non è conosciuto perché spesso misdiagnosticato.

Colpisce prevalentemente la fascia d'età tra i 20 e i 50 anni con una maggiore incidenza nelle donne. In letteratura si descrivono anche casi di bambini e adolescenti per un 4% dei casi totali.³ Bath, in uno studio svolto in India, trovò un maggior numero di casi pediatrici, rispetto alla popolazione globale, supponendo un possibile ruolo di un agente batterico nell'eziopatogenesi del PG⁴.

Il Pioderma Gangrenoso è stato descritto per la prima volta nel 1908 dal dermatologo francese Louis Brocq il quale studiò una serie di casi clinici, che presentavano le caratteristiche cliniche tipiche.

Solo dopo vent'anni, nel 1930, Brusting e colleghi introdussero, per la prima volta, il termine di Pioderma Gangrenoso: Pioderma per indicare l'aspetto purulento delle lesioni, Gangrenoso, invece, ad indicare la necrosi.

Questi autori riprodussero ulcere simili in animali da esperimento inoculando materiale ottenuto da colture provenienti dalle lesioni dei pazienti ed ipotizzarono così che si trattasse di una malattia ad eziologia batterica ma, queste lesioni, al contrario di quanto si pensasse, non rispondevano agli antibiotici, per cui questa ipotesi decadde.

Fulbright et al. ipotizzarono che il PG fosse il risultato di una risposta immune aberrante a fattori non ancora identificati⁵.

Lo sviluppo delle lesioni a livello di aree sottoposte a traumi, sia accidentali che di natura iatrogena, sembra giocare un ruolo nella patogenesi della patologia⁶ ma, l'ipotesi più accreditata ad oggi è ancora che si tratti di una risposta impropria del sistema immunitario e questa teoria sembra validata da una serie di considerazioni.

Prima tra tutte la frequente coesistenza nei pazienti affetti da PG di patologie immunomediate quali IBD (malattie infiammatorie croniche intestinali) in primis ed artriti infiammatorie (artrite reumatoide, spondilite anchilosante o altre artriti sieronegative).

In secondo luogo, l'evidenza che i pazienti trattati con farmaci immunomodulanti, per altre condizioni, traggano giovamento anche per quanto riguarda la lesione di PG.

Terzo, è stato osservato che, alcune malattie genetiche che coinvolgono il sistema immunitario, come la deficienza della glicoproteina d'adesione leucocitaria (LAD) e la sindrome PAPA, rara malattia autosomica dominante caratterizzata dall'associazione di artrite sterile piogenica, PG e acne, sono

spesso associate a PG.⁷

Il PG viene definito come una dermatosi infiammatoria, non infettiva, neutrofilica, a sottolineare il ruolo dei neutrofili in questa patologia, il tipo di cellule infiammatorie predominante nelle biopsie di queste lesioni.

Il PG fa parte, insieme alla Sindrome di Sweet e alla malattia di Bechet, di un ristretto gruppo di malattie non infettive note come dermatosi neutrofiliche, le quali, condividono aspetti clinici, istopatologici e patogenetici.⁸

Studi immunoistochimici hanno dimostrato inoltre che, a livello delle ulcere di PG, è significativamente aumentata l'espressione della mieloperossidasi, importante marker neutrofilico.

Nelle biopsie effettuate sul bordo delle ulcere è stato identificato un abbondante infiltrato di linfociti, insieme a trombosi dei piccoli vasi e stravasato di eritrociti.⁹

Livelli aumentati di CD3 e di CD163, marcatori dei linfociti T e dei macrofagi rispettivamente, si trovano sia a livello del fondo che del bordo dell'ulcera.

Questi reperti suggeriscono che non solo i neutrofili ma anche le cellule T e i macrofagi sono implicati nella patogenesi del PG¹⁰.

Alcuni studi suggeriscono inoltre il ruolo dell'IL-8 nella patogenesi di questa patologia, infatti l'IL-8 è overespressa nelle ulcere di PG e, i suoi livelli sierici calano in seguito ad un trattamento sistemico risultato efficace per il PG stesso.

A questo proposito Oka et al.¹¹ crearono un modello sperimentale di PG trapiantando un lembo di cute umana in un ratto nel quale era stata indotta una SCID (immunodeficienza severa combinata). Dopo l'attecchimento dell'innesto, utilizzarono Adenovirus come vettore di DNA codificante IL-8 umana e lo inocularono nel ratto. Come risultato ebbe luogo un'intensa infiammazione perivascolare di neutrofili che, dopo 12 ore, causò un'ulcerazione del lembo di cute. L'ulcera era cronica e molto simile a quella di PG sia da un punto di vista

clinico che istopatologico.

In associazione a questi dati sono stati riportati livelli elevati anche di IL-1beta, di IL-6, di IFN gamma, di G-CSF, della proteina Elafin e di TNF.

Il TNF, fattore di necrosi tissutale, è una citochina nota per essere spesso associata ad IBD e una delle sue funzioni é proprio quella di produrre IL-8 la quale è un forte fattore chemiotattico per i neutrofili.

I cheratinociti e le cellule T sono le due principali fonti di TNF a livello cutaneo. Ad ulteriore supporto di una risposta aberrante mediata da cellule T alla base dell'insorgenza del PG due gruppi di studio hanno dimostrato la presenza di un'espansione clonale di cellule T nei pazienti affetti. Probabilmente queste cellule sono dirette verso un antigene che ancora non è stato identificato^{12 13}.

Anche le IL-17 e IL-23 sembrano avere un ruolo critico nella patogenesi del PG per il loro ruolo nella migrazione neutrofilica.

In alcune situazioni un ruolo predominante sembra svolto dall'IL-1beta, spesso quando il PG si trova in associazione alla sindrome PAPA. IL-1beta è una citochina proinfiammatoria che si trova normalmente in forma inattiva, e, in seguito a stimoli appropriati viene clivata da una caspasi a formare così la sua forma attiva. In questa patologia, la sindrome PAPA, a causa di una mutazione genetica, la citochina si trova costituzionalmente attivata e dà luogo alle varie manifestazioni tipiche della sindrome. In un numero ridotto di casi i farmaci sono considerati come possibile causa di PG. In particolare sono stati chiamati in causa: isotretinoina¹⁴, sulpiride¹⁵, e GM-CSF. I casi aggravati dal GM-CSF potrebbero essere determinati dal suo effetto diretto sul numero, funzione e/o differenziazione dei neutrofili. In definitiva è possibile concludere che diversi fattori quali predisposizione genetica, infiammazione, fenomeni paraneoplastici e immuni, scatenino o mantengano le alterazioni immunologiche, in particolar

modo dei neutrofili che caratterizzano il PG.

1.1b Pioderma Gangrenoso: Clinica e Varianti

Le lesioni de Pioderma Gangrenoso possono comparire sia spontaneamente che in seguito ad un trauma della cute.

Le lesioni pustolose o ulcere superficiali vanno incontro ad una rapida espansione con la formazione di un'ulcera con fondo necrotico, e bordi sotto minati, irregolari e con un bordo violaceo (*lilac ring*) (Figura 1)

Una volta formatasi, l'ulcera, può crescere sia in modo simmetrico che asimmetrico seguendo l'espansione dei margini sottominati, oppure, può allargararsi tramite la comparsa di nuove pustole periferiche con le quali si fonde. L'ulcera può presentarsi maleodorante in seguito ad infezioni secondarie e spesso è associata ad una forte sensazione di dolore.

Solitamente non si estende oltre il tessuto adiposo sottostante anche se sono state osservate rare lesioni che sono andate più in profondità.

La guarigione di queste lesioni frequentemente esita in cicatrici cribriformi, talvolta deturpanti.



Figura 1 : lilac ring

Il decorso del PG può essere acuto, recidivante o cronico.

La forma cronica-recidivante è più frequentemente associata a malattie sistemiche come la rettocolite ulcerosa, il morbo di Crohn, gammopatie e neoplasie.

Il PG ha come sede preferenziale l'area pretibiale ma può presentarsi in varie sedi quali le mani, il tronco, le mammelle, il collo ed il volto.

Oltre al coinvolgimento della cute il PG può presentarsi anche a livello della mucosa delle alte vie respiratorie, a livello degli occhi, della mucosa dei genitali e dare inoltre quadri di infiltrati neutrofilici a livello dei polmoni, della milza e dei muscoli e , raramente, anche a livello dei reni, del pancreas e del sistema nervoso centrale.

Come ulteriore manifestazione extracutanea è stata osservata, in alcuni casi, anche una osteolisi corticale sterile adiacente alle ulcere di PG.¹⁶

Le manifestazioni di questa patologia sono estremamente variabili, alcuni pazienti presentano una o due ulcere a crescita lenta, mentre altri hanno quadri di ulcere multiple e a crescita molto rapida.

Possono essere presenti alcuni sintomi associati quali febbre, malessere, mialgia ed artralgia. Questi sintomi sistemici derivano probabilmente dall'incremento dell'IL-1beta dovuto all'attivazione dell'inflammasoma e alla conseguente cascata infiammatoria costituzionalmente attivata.

Esistono quattro varianti cliniche principali di PG: la forma classica ulcerativa, la forma pustolosa, quella bollosa e quella vegetativa. (Tabella1)

Alcuni pazienti presentano un unico sottotipo mentre altri ne presentano diversi contemporaneamente.

Alcune varianti presentano una maggiore affinità con alcune malattie sottostanti come, ad esempio, la forma pustolosa con le IBD.

Vediamo le varianti principali :

- **PG CLASSICO** : è spesso caratterizzato da un'ulcera rapidamente progressiva con margini sotto minati, indurimento periferico e bordo violaceo.
Il fondo dell'ulcera presenta comunemente tessuto necrotico e fibrina. La forma ulcerativa di PG si localizza nel 70% dei casi a livello degli arti inferiori, ma può presentarsi anche in altre sedi come, ad esempio, a livello dell'occhio¹⁷ con interessamento della sclera e conseguente perforazione oculare¹⁸.
- **PG PUSTOLOSO** : questa variante è stata descritta per la prima volta da O'Loughlin e Perry in due pazienti con Colite Ulcerosa acuta nei quali erano comparse eruzioni pustolose diffuse, senza la formazione di ulcere. Le pustole erano estremamente dolenti e interessavano gli arti, la parte superiore del tronco e si associavano ad una severa esacerbazione della colite con associata febbre e artralgia¹⁹. Questa variante, infatti, come visto precedentemente, è comunemente

associata ad IBD ed ha la caratteristica di andare incontro a remissione con il controllo di questa comorbidità; è caratterizzata da multiple pustole sterili con un circostante alone eritematoso.

L'istopatologia rivela un infiltrato neutrofilico a livello del derma e piccoli ascessi pustolosi a livello sottocorneale.

- **PG BOLLOSO** : questa forma di PG è stata descritta per la prima volta nel 1972 da Perry e Winkelmann, che hanno riportato una forma di PG superficiale bolloso in 3 pazienti affetti da leucemia²⁰. Questa variante si presenta tipicamente con un gruppo di pustole che si diffondono rapidamente e vanno incontro a fusione in bolle e successivamente si ulcerano con necrosi centrale e alone periferico violaceo.

La forma bollosa insorge tipicamente in sedi atipiche, quali il dorso delle mani, la superficie estensoria degli arti e la testa, spesso si presenta come fenomeno paraneoplastico in pazienti affetti da malattie linfoproliferative.

Nei pazienti con patologie ematologiche la presenza di Pioderma Gangrenoso può indicare una trasformazione maligna ed è suggestiva di una malattia aggressiva con prognosi scarsa.

- **PG VEGETANTE**: Viene definito anche come PG superficiale granulomatoso, è una forma cronica, indolente, non aggressiva, che si manifesta principalmente negli adulti e a livello del tronco, anche se sono stati segnalati dei casi a livello del volto, dello scroto e degli arti²¹. Si presenta come una lesione vegetante, solitaria ed eritematosa che non presenta il bordo violaceo tipico della variante classica.

Istologicamente, questa variante, è caratterizzata da granulomi che presentano una struttura a tre strati: al centro si trovano i neutrofili, circondati da una palizzata di istiociti la quale, a sua volta, è contenuta all'interno di un infiltrato linfocitico.

Questa è la variante più rara e, solitamente, mostra una buona risposta a trattamenti meno aggressivi rispetto a quelli necessari per le altre varianti, inoltre, il PG vegetante presenta meno frequentemente associazioni con disordini sistemici sottostanti. Per poter fare diagnosi di certezza di PG vegetante è necessario escludere, tramite il ricorso ad esami biotici o colturali, la presenza di alcune condizioni con aspetti clinici simili, in particolare le infezioni batteriche e micotiche. Patologie che possono entrare in diagnosi differenziale con questa forma sono: il pioderma blastomicosi-like²², infezioni e dermatite factitia. Il pioderma blastomicosi-like è simile ad un'eruzione cronica vegetante che interessa le estremità e si caratterizza per la presenza di placche granulomatose e verrucose ricoperte da pustole. Tale forma si manifesta, spesso, in soggetti immunocompromessi e potrebbe rappresentare una risposta tissutale esuberante ad infezioni batteriche²³.

Oltre a queste principali varianti il PG può presentarsi anche in altre forme particolari: peristomale, genitale, mucoso, extra cutaneo e postoperatorio.

Nella clinica del PG è molto importante tenere in considerazione il fenomeno della *patergia*, inteso come un 'eccessiva risposta della cute a piccoli traumi che provoca la formazione di pustole o di ulcerazioni che compaiono circa 24 ,48 ore in seguito al trauma.

Per questo motivo il debridement non è raccomandato nei pazienti affetti da PG in fase acuta, dal momento che rischia di causare un peggioramento della condizione.

Tale fenomeno è stato descritto in circa il 25 % dei casi di PG ulcerativo.

La patergia non è specifica del PG, può, infatti, essere osservata anche in altre patologie come la sindrome di Bechet, nonostante ciò può comunque fornire un supporto per la diagnosi.²⁴

Tabella 1. Varianti cliniche di Pioderma Gangrenoso.

VARIANTI CLINICHE	CARATTERISTICHE
<i>ULCERATIVO</i>	Ulcere a rapida evoluzione. Prevalente localizzazione a livello degli arti inferiori e del tronco.
<i>PUSTOLOSO</i>	Pustole. Frequente associazione con IBD. Colpisce in prevalenza gli adulti e si localizza a livello del tronco.
<i>BOLLOSO</i>	Bolle superficiali con successiva evoluzione a ulcere.
<i>VEGETANTE</i>	Vegetazioni

1.1c Pioderma Gangrenoso: Comorbilità

Il PG è una patologia che colpisce cute e mucose, in più della metà dei casi, è associato ad una patologia sistemica sottostante, la quale si può presentare prima, in coincidenza oppure in seguito alla diagnosi del PG stesso.

Le patologie più frequentemente associate al PG sono di tipo infiammatorio e neoplastico.

La Colite Ulcerosa è riscontrata nel 10-15 % dei casi e con una frequenza simile si trova l'associazione con la Malattia di Crohn.

Nonostante ciò, meno del 3% dei pazienti con queste patologie intestinali presenta PG.

Come le malattie croniche infiammatorie dell'intestino siano correlate, o, in qualche modo causino il PG non è ancora stato completamente chiarito.

Alcuni studi sostengono che il meccanismo di innesco sia il risultato di una reazione immunologica diretta contro batteri o contro antigeni alimentari entrati in circolo per mezzo delle lesioni della mucosa colica.²⁵

In ogni caso la relazione tra queste due condizioni è stata confermata ed è inoltre stata dimostrata la scomparsa delle lesioni cutanee in seguito ad una colectomia totale²⁶ così come un miglioramento del PG in seguito alle terapie mediche per la patologia intestinale.

Altre patologie descritte in associazione al PG sono l'epatite C, l'Artrite Reumatoide sieronegativa, le spondiliti ed un ampio spettro di disordini linfoproliferativi come, ad esempio, gammopatie monoclonali, leucemie, linfomi e la sindrome mielodisplastica. La gammopatia monoclonale è presente in circa il 10% dei pazienti con PG, in genere è la forma ulcerativa che si associa a questa patologia. La frequenza dell'associazione tra PG e neoplasie non è certa,

ma si ritiene si aggiri intorno al 7%. La leucemia mieloide acuta e cronica, sia negli adulti che nei bambini, è tra le neoplasie quella che più frequentemente si associa al PG., in particolar modo alla variante bollosa, talvolta i pazienti muoiono entro 12 mesi dalla comparsa delle lesioni cutanee. Il coinvolgimento delle mani sembra più frequentemente correlato a forme linfoproliferative piuttosto che a malattie infiammatorie croniche intestinali.²⁷

L'associazione con forme artritiche sembra avere una prognosi peggiore rispetto agli altri casi.

Il PG è una tipica presentazione delle sindromi PAPA e PASH. La prima, nota anche come Artrite Familiare Ricorrente, è una malattia a trasmissione autosomica dominante, caratterizzata dall'associazione di PG, Artrite Piogenica ed Acne.

Questa sindrome si presenta nell'infanzia come un'artrite ricorrente sterile ed erosiva con un danno significativo a livello delle articolazioni ed è causata da un'aberrante produzione di IL -1²⁸. La PASH è, invece, una sindrome caratterizzata dall'associazione tra PG, Acne ed Hidrosadenite suppurativa, quest'ultima è una patologia dermatologica cronica, relativamente rara, ad eziologia ignota, caratterizzata dall'iniziale comparsa di noduli prevalentemente a livello del cavo ascellare, della regione inguinale e perianale che, successivamente, evolvono in ascessi molto dolorosi²⁹.

Il PG può essere associato anche al virus HIV, al Lupus Eritematoso Sistemico, alla sindrome di Takayasu e ad anche ad alcuni tumori solidi come carcinomi del colon, della prostata, della mammella, dei bronchi e delle ovaie.

Sono stati inoltre osservati alcuni casi associati alla gravidanza.

1.1d PIODERMA GANGRENOSO: DIAGNOSI E DIAGNOSI DIFFERENZIALI

La presenza di varianti cliniche multiple e la frequente sovrapposizione con altre patologie, spesso osservate nella pratica clinica, rendono la diagnosi del pioderma gangrenoso spesso complessa e tardiva. Le cause alla base della formazione di ulcere cutanee sono innumerevoli, includono infezioni, tumori, disordini vascolari, vasculiti e traumi per cui la diagnosi di PG è sostanzialmente una diagnosi di esclusione. Clinicamente il PG è caratterizzato da un'ulcera rapidamente progressiva, dolorosa, con margini irregolari, violacei e sottominati. L'aspetto clinico è molto importante nel procedimento diagnostico e, in associazione all'esclusione di altre cause di ulcerazione cutanea, costituisce il criterio maggiore tra quelli proposti da Su et al.³⁰ (Tabella 2).

Tabella 2. Criteri diagnostici (Su et al. And AlGhazal et al³¹.)

Criteri maggiori
Ulcera o pustola sterile con bordi violacei e bordi sotto minati.
Esclusione di altre possibili cause.
Criteri minori
Storia suggestiva di patergia
Riscontro istopatologico di neutrofilia sterile e /o di infiltrato infiammatorio misto e/o di vasculite linfocitaria
Patologia sistemica associata
Rapida risposta a terapia sistemica immunosoppressiva
Ulcera estremante dolorosa(VAS>4)

VAS=Visual analogue score.

La diagnosi può essere effettuata se sono presenti i due criteri maggiori e almeno due dei criteri minori.³²

L'anamnesi patologica del paziente è di estrema importanza per individuare eventuali patologie sottostanti.

Non esistono parametri laboratoristici di riferimento per la diagnosi di PG.

La biopsia è indispensabile nell'escludere diagnosi alternative e spesso sono necessarie biopsie multiple sia del fondo che del bordo della lesione. Le modificazioni patologiche della cute dipendono dal tipo di lesione (ulcerativa , pustolosa, bollosa o vegetante) dallo stadio dell'evoluzione e dalla sede in cui è stato prelevato il campione bioptico.

Le lesioni attive, in espansione, presentano tipicamente un denso infiltrato neutrofilico a livello del derma con la frequente formazione di microascessi .

La vasculite non è il reperto principale ma talvolta può essere presente in forma leucocitoclastica.

Le forme di ulcere avanzate invece presentano solitamente al centro necrosi del tessuto e infiltrato di cellule mononucleate alla periferia.

La diagnosi deve inoltre includere gli esami ematochimici di routine, elettroforesi e immunoelettroforesi delle proteine sieriche, markers epatiti, anticorpi antifosfolipidi, ANA e ANCA, Fattore Reumatoide, l'analisi delle urine e, in alcuni casi, un'indagine colonscopica per escludere condizioni patologiche coesistenti quali, in primis, malattie infiammatorie croniche intestinali (Tabella 3).

Tabella 3. Iter diagnostico del Pioderma Gangrenoso

Anamnesi: trauma, farmaci, sintomatologia generale
Studio delle lesioni: sede, dimensioni, tipo, bordi, profondità
Esame obiettivo generale: valutazione gastrointestinali, linfadenopatie etc
Esami ematochimici: elettroforesi e immunoelettroforesi, proteine sieriche, markers epatiti, ANA, ANCA, FR, Antifosfolipidi, screening lue Coltura dell'ulcera (batterica, virale, micotica) Radiografia del torace o in altre sedi se indicate Endoscopia Aspirato osteomidollare TC (nel sospetto di ascesso)
Biopsia cutanea
Stabilizzazione del paziente (ospedalizzazione vs assistenza ambulatoriale)

Per quanto riguarda le diagnosi differenziali sono varie le patologie da tenere in considerazione dal momento che, da un punto di vista clinico, possono essere estremamente simili al Pioderma Gangrenoso.³³

Le prime ulcere ad entrare in diagnosi differenziale con il PG, specialmente nella fase cronica, sono le ulcere arteriose che presentano dolore e necrosi, è, tuttavia possibile che il PG si presenti in pazienti affetti da insufficienza venosa, in queste situazioni la diagnosi risulta più complessa dal momento che il PG potrebbe essere scambiato per un ulcera venosa.

L'arteriolopatia calcifica uremica (calcifilassi) caratterizzata da deposito di calcio all'interno delle pareti dei vasi di piccolo calibro nel derma e nel tessuto sottocutaneo³⁴ è caratterizzata da dolore spiccato e da rapida evoluzione e può essere messa in diagnosi differenziale.

Altro importante gruppo di patologie da tenere in considerazione nella diagnosi differenziale sono le vasculiti come la Sindrome di Wegener, la Sindrome di Behcet e la Sindrome da anticorpi antifosfolipidi.

Neoplasie che posso, anche se raramente, determinare lesioni simil-PG includono il carcinoma squamocellulare, il linfoma cutaneo e carcinomi metastatici.

Anche alcuni processi infettivi possono simulare le lesioni di PG, tra queste abbiamo: cellulite, ulcere erpetiche, infezioni micobatteriche atipiche, Tubercolosi cutanea, Leishmaniosi, Sporicotricosi, Criptococchi, Istoplasmosi, Blastomicosi ed Ectima gangrenoso.

Non vanno dimenticate le lesioni da danno esogeno come le ulcere fittizie, facenti parte dell'ampio quadro della Sindrome di Munchausen, punture di ragni e insetti e ulcere iatrogene da iniezione di droghe.

Una sede atipica del PG è rappresentata dalla zona ano genitale, le lesioni formatesi in questo distretto possono essere considerate, erroneamente, come manifestazioni cutanee della malattia di Crohn o come gangrena di Fournier.

La gangrena di Fournier è una forma molto aggressiva di fascite necrotizzante infettiva che si manifesta a livello del perineo, della regione perianale e genitale che colpisce pazienti con comorbidità, in particolar modo diabete mellito e alcolismo.³⁵

È importante riconoscere questa patologia dal momento che la gestione del paziente in questi casi è completamente diversa: la gangrena di Fournier viene trattata con somministrazione di antibiotici ad ampio spettro, stabilizzazione emodinamica e debridement chirurgico.³⁶

1.1e Pioderma Gangrenoso : TERAPIA

L'obiettivo del trattamento del Pioderma Gangrenoso è quello di ridurre lo stato infiammatorio per promuovere la guarigione dell'ulcera minimizzando gli effetti collaterali della terapia. Non esiste un "gold standard" nella terapia del Pioderma Gangrenoso, il clinico dovrà avere un approccio personalizzato ad ogni singolo caso, tenendo in considerazioni diverse variabili: il numero, la sede e la profondità delle lesioni, le malattie associate, le condizioni generali del paziente e i rischi correlati al ricorso ad una determinata terapia.

L'approccio terapeutico è diverso nei pazienti che hanno malattia isolata rispetto a quelli che presentano delle comorbidità, in questo secondo gruppo di pazienti il trattamento è mirato al controllo delle condizioni patologiche associate che,

tuttavia non è sempre possibile e può comprendere colectomia totale in caso di pazienti affetti da colite ulcerosa, plasmaferesi o aferesi di granulociti nei pazienti con leucemia o Talidomide nei pazienti con sindrome mielodisplastica. È possibile effettuare sia un trattamento locale della lesione che un trattamento di tipo sistemico.

La maggior parte dei casi di PG necessita di un approccio terapeutico di tipo sistemico che purtroppo spesso è insufficiente per ottenere una guarigione completa. I corticosteroidi per os (1.2 mg/Kg/die) rappresentano i farmaci di prima scelta nella terapia di questi pazienti che, a causa degli effetti collaterali della terapia steroidea protratta (Sindrome di Cushing iatrogena) devono essere monitorati soprattutto per quanto riguarda la glicemia e la pressione arteriosa e devono ricevere supplementi di calcio, vitamina D e bifosfonati.

Molti altri farmaci immunosoppressori possono essere utilizzati, tra questi : la Ciclosporina (2-3 mg/Kg/die), farmaco immunosoppressore, può costituire un valida alternativa nei pazienti resistenti alla terapia cortisonica o in coloro che presentano importanti effetti collaterali dovuti a questa. Cortisone e Ciclosporina possono essere anche usati in associazione nella terapia del PG. Possono inoltre essere utilizzati il Micofenolato Mofetile, l'Azatioprina, il Methotrexate, la Ciclofosfamide e la Talimodide. Nella terapia del PG abbiamo oggi a disposizione anche i farmaci biologici come l' Infiximab, l' Adalimumab e l' Etanercept.

Infiximab ³⁷è un anticorpo monoclonale chimerico anti TNF- α , composto da una regione umana costante di IgGk (75%) e da regione variabile murina(25%) legante l'antigene ad alta affinità per gli anticorpi umani anti TNF- α . Infiximab si lega soprattutto, con alta affinità, alla forma transmembranaria di TNF- α , neutralizzandone gli effetti in vivo. Gli effetti collaterali più comuni sono:

cefalea, rash, diarrea, rinite e tosse. L'incidenza di infezioni lievi, in corso di terapia, è aumentata; le più frequenti, con incidenza del 4,6% per entrambe, sono quelle delle vie aeree superiori e urinarie, infezioni gravi con conseguenze fatali, sebbene rare, sono state riportate³⁸.

Adalimumab³⁹ è il primo anticorpo monoclonale completamente umano diretto contro il TNF- α . Possiede un'alta specificità e sensibilità per il TNF- α e blocca l'interazione del TNF- α con i recettori cellulari di superficie p55 e p75.

Etanercept è una proteina di fusione ottenuta, tramite tecniche di DNA ricombinante, dall'unione del recettore umano p75 per il fattore TNF- α con la frazione Fc dell'immunoglobulina umana IgG1. La proteina funziona da recettore solubile per il TNF- α per il quale possiede un'affinità più alta di quella degli altri recettori solubili.

Questi nuovi farmaci biologici agiscono tutti sul TNF- α , citochina infiammatoria di notevole importanza nella determinazione del PG, svolge infatti numerose attività, tra le quali: apoptosi, necrosi tumorale, attivazione e metabolismo dei granulociti, linfociti, eosinofili, fibroblasti, condrociti e cellule endoteliali; inoltre è responsabile della formazione dell'edema, prende parte alla formazione del granuloma, attiva la cascata coagulativa, ed è implicata nel richiamo di cellule infiammatorie.

La terapia locale del PG ha come obiettivi la riduzione del processo flogistico, la gestione dell'essudato, la prevenzione di infezioni secondarie e la gestione della sintomatologia dolorosa, prevede l'utilizzo di medicazioni avanzate non aderenti che riducono eventuali traumatismi legati alla loro rimozione. Con la stessa finalità possono essere utilizzati gli innesti, in particolar modo quelli omologhi, che presentano il vantaggio di stimolare la riparazione tissutale e di controllare, alleviare il dolore.

I farmaci maggiormente impiegati nella terapia locale sono i Glucocorticoidi, il Tacrolimus, il Pimecrolimus, la Nicotina e il Sodio Cromoglicato.

Pimecrolimus e Tacrolimus sono due inibitori delle calcineurine, la loro azione consiste nell'inibizione dell'attività delle cellule T e quindi del rilascio di numerose citochine infiammatorie, incluse IL-2, IL-4, IL-10 e TNF- α . Un'altra applicazione della terapia locale prevede l'iniezione intralesionale di glucocorticoidi. Quest'ultima metodica, nonostante alcuni casi siano stati trattati con successo, è sconsigliata come intervento di prima linea per il rischio di indurre la comparsa di nuove lesioni a causa del fenomeno della patergia.

Nella gestione di una ferita acuta o cronica sono di fondamentale importanza la rimozione delle cause, il ripristino di una corretta vascolarizzazione e la valutazione della guarigione; tuttavia, queste procedure possono non essere sufficienti ad ottenere la guarigione della lesione⁴⁰.

Per impostare una terapia adeguata è necessario considerare i fattori sistemici e locali che possono causare una mancata guarigione.

L'immunodepressione del paziente, primaria o iatrogena, e la malnutrizione sono tra i principali fattori sistemici che interferiscono con la guarigione della lesione (Tabella 4).

Tabella 4: Fattori che influiscono su una mancata guarigione

Fattori Locali	Fattori sistemici
<p>TESSUTO NECROTICO</p> <p>INFEZIONE O BIOFILM</p> <p>ECCESSIVO ESSUDATO</p> <p>AUMENTO METALLOPROTEASI</p> <p>SENESCENZA CELLULARE</p> <p>IPOSSIA</p> <p>TRAUMI RIPETUTI</p> <p>RADIAZIONI</p>	<p>DIABETE</p> <p>ANEMIA</p> <p>MALNUTRIZIONE</p> <p>IMMUNODEFICIENZA</p> <p>FARMACI IMMUNOSOPPRESSIVI</p> <p>ETA'</p> <p>OBESITA'</p> <p>FUMO</p>

1.2 WOUND BED PREPARATION

La WBP è un protocollo di gestione della lesione cronica che si focalizza sugli aspetti di mancata guarigione per poi andare ad agire sui fattori endogeni e stimolare l'efficacia delle terapie locali e sistemiche.⁴¹

Il concetto di preparazione del letto delle ferite (WBP) ha assunto un impatto significativo sulla gestione delle lesioni croniche della cute, e, per poterlo applicare nel modo migliore, è stato introdotto l'acronimo **TIME** a sottolineare i quattro aspetti sui quali si focalizza (Tabella 5): management del tessuto, infezione o infiammazione, macerazione ed equilibrio dell'essudato e riepitelizzazione.

Tissue (management del tessuto) questo concetto nasce dal presupposto che le cellule della lesione cronica siano senescenti e scarsamente proliferanti e che, di conseguenza, la loro presenza nel letto della ferita, ostacoli l'azione di fattori di

crescita, la migrazione di cellule vitali, motivo per il quale si rende di fondamentale importanza rimuovere il tessuto necrotico attraverso il debridement.

Con il termine *debridement* si intende la rimozione del tessuto devitalizzato dal letto della ferita in quanto la sua presenza è strettamente correlata ad un aumento del rischio di infezione, ad un aumento delle richieste metaboliche locali, inoltre altera il ripristino dell'architettura tissutale, rallenta e inibisce il processo di guarigione ⁴².

Infection/Infiammation sottolinea la presenza di infezione e infiammazione. In base alla virulenza, alla carica batterica e alle difese immunitarie dell'ospite, si possono avere una *contaminazione* ovvero la presenza di microrganismi non replicanti; una *colonizzazione* nella quale i microrganismi sono replicanti ma non determinano danno all'ospite ed, infine, un' *infezione* che determina il danno biologico all'ospite ed ostacola il risanamento del tessuto ⁴³.

La terapia antimicrobica si compone dell'impiego locale di antisettici (antimicrobici che agiscono su più siti bersaglio del microrganismo) seguita o meno dall'uso di antibiotici sistemici. L'utilizzo degli antibiotici viene riservato nei casi in cui siano presenti i segni clinici di infezione, per ridurre al minimo il rischio di farmaco-resistenza.

Moisture imbalance ovvero lo squilibrio idrico che può influenzare la migrazione cellulare in caso di disidratazione, o provocare una macerazione del tessuto in caso di eccesso di essudato ⁴⁴.

Le principali cause di macerazione della cute sono da ricercare principalmente o in una medicazione effettuata in modo non appropriato o in un ridotto numero di cambi della stessa, entrambe situazioni che comportano un'esposizione prolungata della cute all'essudato, essudato ricco di sostanze che possono

ostacolare o ritardare il risanamento della lesione. Per questo motivo si sono sviluppate medicazioni avanzate che assorbono l'eccesso di essudato e, nel frattempo, migliorano l'ambiente biochimico del letto della ferita, favorendo l'azione dei fattori di crescita, la proliferazione e la migrazione cellulare⁴⁵.

Epidermal margins indispensabili per la rimarginazione della lesione; ci può essere un deficit di migrazione cheratinocitaria o una disfunzione cellulare che devono essere corrette attraverso il debridement, medicazioni bioattive, innesti cutanei o terapie adiuvanti.

Deve essere valutato il grado di avanzamento dei margini per poter prevedere il progresso della lesione, è stato infatti dimostrato che la riduzione della superficie del letto della ferita si correla con la guarigione⁴⁶.

La lesione e l'area che la circonda devono essere esaminate attentamente in ogni aspetto per impostare un'ottimale WBP: sede, dimensione e profondità, odore, colore e quantità dell'essudato, colore e consistenza dei bordi, presenza di margini sottominati, presenza di materiale necrotico, carica batterica, dolorabilità⁴⁷.

I criteri di scelta di una buona medicazione si basano sui seguenti presupposti (linee guida della Agency of Health Care Policy and Research 1994 rivisitate da L. Ovington nel 1999):

- il bendaggio deve mantenere un certo grado di umidità locale
- valutare clinicamente la medicazione in rapporto al tipo di ulcera
- preferire le medicazioni umide che mantengano asciutta la cute perilesionale
- utilizzare un bendaggio che controlli l'essudato senza provocare l'essiccamento del letto della lesione: un mancato controllo dell'essudato può provocare macerazione dei margini e un ulteriore deterioramento della ferita

- prediligere medicazioni di facile applicazione che non richiedano di essere cambiate frequentemente⁴⁸.

Tabella 5: Wound Bed Preparation

COMPONENTI	PROBLEMI	SCOPO	AZIONI
Management del tessuto	Il tessuto necrotico altera la valutazione dell'ulcera, favorisce l'infezione e il danno da parte delle metalloproteasi	Ridurre il tessuto necrotico per ristabilire un buon letto della ferita	Debridement <ul style="list-style-type: none"> • chirurgico • meccanico • autolitico • chimico • enzimatico
Controllo dell'infezione	Biofilm: rilascio di tossine batteriche, infiammazione immunosoppressione	Ristabilire il bilancio batterico	Riconoscere la colonizzazione critica e l'infezione Attuare medicazioni antimicrobiche topiche,antisettici ed antibiotici orali

<p>Equilibrio dell'essudato</p>	<p>L'eccessiva essudazione provoca macerazione. La secchezza inibisce l'attività cellulare promuove la formazione di escara</p>	<p>Bilancio dell'essudato: Stimola i fattori di crescita, le citochine e la proliferazione cellulare</p>	<p>Dipende dal grado di essudazione:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Medicazioni assorbenti o no • Medicazioni biologiche • P negativa • Terapia sistemica per controllare edema e infiammazione. • Bendaggi compressivi
<p>Promuovere la riepitelizzazione</p>	<p>Il tessuto necrotico costituisce una barriera così come la presenza di calli e ipercheratosi.</p>	<p>Promuovere la riepitelizzazione dal bordo e la contrazione dell'ulcera.</p>	<p>Rimuovere il tessuto necrotico</p> <p>Rimuovere il callo e l'ipercheratosi</p> <p>La pressione negativa favorisce la contrazione dell'ulcera</p> <p>Medicazioni avanzate e innesti</p>

1.3 INNESTI CUTANEI

Per innesto si intende il trasferimento di una porzione di tessuto, privato di tutte le connessioni vascolari, dalla sua sede di origine ad un'altra sede⁴⁹. Gli innesti cutanei rappresentano ancora oggi il gold standard per ricoprire ampie aree andate incontro a perdita di tessuto cutaneo. Il concetto generale alla base di questa procedura è quello di poter prelevare la cute da un'area in cui il sito donatore potrà guarire lasciando cicatrici minime, e trapiantarla laddove risulti necessario, così da garantire un risultato clinico riparativo. Gli innesti cutanei possono essere classificati in relazione al sito anatomico del prelievo e del trapianto, in base allo spessore del tessuto prelevato e in base alla loro origine biologica.

La scelta fra questi diversi tipi di innesto si fonda sul tipo di lesione e sul quadro clinico del paziente.

In base alle sedi anatomiche del sito donatore/ricevente si distinguono gli innesti in:

- *isotopici*: i siti, donatore e ricevente, sono analoghi (es. il trasferimento di cute da un braccio all'altro).
- *ortotopici*: i siti, in questo caso, non sono analoghi ma si tratta dello stesso tipo di tessuto.
- *eterotopici*: il tessuto del sito donatore è diverso rispetto a quello del sito ricevente.

Seguendo il criterio dello spessore del tessuto possiamo parlare di:

- *innesti a tutto spessore o ful-thickness skin graft* : possiedono uno spessore superiore agli 0,6 mm, e sono composti dall'epidermide e dall'intero derma con le strutture annessiali.
- *innesti a spessore parziale o split-thickness skin graft* : costituiti da epidermide e da una parte di derma di spessore variabile in base al quale, a loro volta sono ulteriormente suddivisi in : *sottili o di Thiersch-Ollier* (spessore di 0,15-0,3 mm) costituiti dall' epidermide e dalla parte più superficiale del derma, *ad un terzo di spessore o di Blair-Brown* (spessore di 0,3-0,45 mm) costituiti dall' epidermide e dal terzo superiore del derma ed *innesti a due terzi di spessore o di Padgett* (spessore di 0,45-0,6 mm) costituiti dall' epidermide e dai due terzi superiori del derma⁵⁰.

Gli innesti a tutto spessore sono quelli che garantiscono un risultato estetico migliore poiché mantengono le caratteristiche del sito di prelievo, non si retraggono e rimangono morbidi ed elastici, tuttavia, la probabilità di attecchimento è inversamente proporzionale al loro spessore.

Viceversa, quanto più è sottile l'innesto, tanto più scadente sarà il risultato estetico e funzionale perché l'innesto sottile, nel tempo, tende a retrarsi, a cambiare colore e ad assumere un aspetto similcicatriziale ma maggiore sarà la probabilità di attecchimento.

Da un punto di vista dell'origine biologica dell'innesto si distinguono⁵¹ :

- *innesti autologhi (autografts)*: il donatore ed il ricevente sono lo stesso soggetto.
- *innesti omologhi (allografts)*: il donatore ed il ricevente sono soggetti differenti appartenenti alla stessa specie.
- *innesti eterologhi (xenografts)*: il donatore ed il ricevente appartengono a specie diverse

Sono soltanto gli innesti autologhi a garantire un attecchimento definitivo⁵². In questo caso l'area di prelievo viene scelta a priori: per innesti sottili e medi si considerano le cosce, i glutei e l'addome, per quelli più spessi si prediligono zone di cute morbida e uniforme come la regione della piega del gomito, la superficie interna del braccio e così via⁵³.

Prima di procedere è necessario assicurarsi che il letto della ferita sia stato ben preparato e sia idoneo allo scopo : l'area ricevente deve essere ben deterata, vascolarizzata, non infetta e priva di essudato o di materiale necrotico.

Solo dopo questo passaggio si procede al prelievo di uno strato di cute con uno spessore regolare.

A seconda dell'estensione del sito ricevente è opportuno disporre di skin grafts espandibili, quindi si ricorre all'utilizzo di un dispositivo (mesher) che li trasforma in reticoli modellabili secondo la geometria della lesione .

Lo skin graft e il letto della ferita vengono posti in contatto attraverso una colla di fibrina.

Una volta che l'innesto viene impiantato nell'area ricevente, si devono creare nuovi collegamenti vascolari e nervosi; in questo frangente temporale la

sopravvivenza dell'innesto dipende dall'imbibizione sierica esercitata dal letto della ferita, dopodiché iniziano a formarsi anastomosi vascolari tra l'innesto e l'area ricevente che si completano in media in una ventina di giorni⁵⁴.

Gli innesti eterologhi prevedono l'utilizzo di cute di origine suina che viene impiegata come copertura temporanea di una lesione con lo scopo di fornire uno stimolo biologico al letto della ferita e promuovere la formazione del tessuto di granulazione. Anche gli innesti omologhi svolgono una funzione transitoria, infatti a meno che il paziente non sia fortemente immunodepresso, vanno incontro a rigetto nell'arco di 2-3 settimane; tali innesti sono quindi impiegati generalmente per rivestire ampie aree di cute e ristabilire temporaneamente la barriera cutanea.

Gli innesti omologhi erano inizialmente riservati al trattamento dei pazienti ustionati per la copertura temporanea delle lesioni dovute a perdita di sostanza⁵⁵. Oggi il trapianto di cute da donatore è molto utilizzato, oltre che nel rivestimento di superfici ustionate nelle quali deve essere ripristinata tempestivamente la funzione di barriera cutanea, anche nelle ulcere croniche sia ad eziologia vascolare che infiammatoria, come nel caso delle lesioni di Pioderma Gangrenoso. La cute da donatore può sostituire efficacemente l'innesto autologo al fine di:

- impedire le perdite di acqua, di elettroliti e soprattutto di proteine
- mantenere una temperatura corporea adeguata
- svolgere una funzione di barriera contro agenti fisici e microbiologici
- ridurre o eliminare il dolore.

Il diffondersi dell'utilizzo della cute sia da donatore sia da cadavere ha portato alla nascita dei Centri di conservazione della cute.

La Regione Toscana con propria delibera del gennaio 1998 ha istituito presso l'Istituto di Scienze Dermatologiche dell'Università degli Studi di Siena una Banca Regionale dei Tessuti e delle Cellule, in grado di allestire e conservare i lembi cutanei da impiegare a scopo di trapianto.

Per tali lembi sono stati codificati dei criteri di idoneità, che riguardano:

- il consenso alla donazione degli organi e dei tessuti;
- le caratteristiche macroscopiche del tessuto cutaneo, quali dimensioni, spessore minimo, ecc.
- il controllo di sterilità della cute prelevata mediante indagini sierologiche e microbiologiche.

La cute crioconservata viene prelevata di solito dal dorso o dalla coscia della persona che ha dato il consenso alla donazione, utilizzando un dermatomo che permette di ottenere dei lembi cutanei di 0,3 – 0,5 mm di spessore. Tali lembi vengono dapprima messi in contatto con una soluzione di antibiotico, quindi incubati con una soluzione di glicerolo al 15% per 3 ore, infine vengono messi in camera di congelamento e conservati a meno 80 gradi centigradi.

La cute glicerolizzata viene anch'essa prelevata dal dorso o dalla coscia della persona che ha dato il consenso alla donazione, utilizzando un dermatomo che permette di ottenere dei lembi cutanei di 0,3 – 0,5 mm di spessore. Questi lembi vengono incubati con antibiotici, quindi messi in contatto progressivamente con una soluzione di glicerolo al 50% per un periodo di 3 ore, poi con una soluzione

di glicerolo al 75% per altre 3 ore, quindi con una soluzione di glicerolo all'87% per ulteriori 3 ore. I lembi glicerolizzati vengono, infine, conservati nella Banca della cute ad una temperatura variabile tra 4 e 8 gradi centigradi.

A differenza della cute fresca, che è utilizzabile entro pochi giorni, perché con il passare delle ore diminuisce progressivamente la sopravvivenza cellulare, la cute crioconservata e quella glicerolizzata possono essere utilizzate anche dopo molti mesi dalla loro preparazione.

In genere la cute crioconservata dà migliori risultati rispetto alla glicerolizzata, perché, una volta scongelata e ricostituita, mantiene intatta la sua vitalità e può essere facilmente integrata nel letto dell'ulcera.⁵⁶

La cute glicerolizzata, viceversa, non è vitale, ma mantiene intatte le sue caratteristiche strutturali e meccaniche, per cui costituisce una medicazione biologica ideale.

Se il campione viene utilizzato entro 72 ore è sufficiente riporlo in frigorifero a 4° C. Purtroppo vengono rigettati nell'arco di due settimane (a meno che il paziente non sia fortemente immunosoppresso), quindi si impiegano transitoriamente per rivestire ampie aree di cute. Anche in questo caso, a seconda dell'estensione del sito ricevente, è opportuno disporre di skin grafts espandibili, quindi si ricorre all'utilizzo di un dispositivo (mesher) che li trasforma in reticoli modellabili secondo la forma della lesione. Il sito ricevente deve essere provvisto di una vascolarizzazione sufficiente a garantire l'attecchimento dell'innesto, per cui, nelle lesioni che espongono tessuto osseo, tendineo o cartilagine, difficilmente questo può avvenire⁵⁷.

Spesso la cute glicerolizzata viene sottoposta ad un trattamento di “deepidermizzazione”, in maniera da ottenere il cosiddetto “DED”.

Poiché negli innesti omologhi la cute utilizzata non appartiene al soggetto ricevente, quest’ultimo attiva il sistema immunitario e quindi meccanismi di difesa che tendono a rigettarla.

Nel 1936 furono identificati da Gorer⁵⁸ per la prima volta nei linfociti di topo un gruppo di antigeni, definiti come “Complesso Maggiore di Istocompatibilità”, i quali si dimostrarono molto importanti nel condizionare l’evoluzione dei trapianti, soltanto quando il soggetto donatore ed il ricevente possiedono questi stessi antigeni il trapianto va a buon fine.

Poiché a livello cutaneo il Complesso Maggiore di Istocompatibilità si ritrova soltanto nelle cellule di Langherans, fagociti mononucleati dell’epidermide, è chiaro che l’eliminazione di questo strato diminuisce le possibilità di rigetto dell’allograpianto, quindi si preferisce utilizzare il derma deepidermizzato o “DED”.

La cute crioconservata è da considerarsi immunologicamente inerte per l’assenza dei prodotti della classe II MHC provocata dal congelamento.

Sono controindicazioni all’innesto le ferite colonizzate-infette (si parla di 10^6 batteri/g di tessuto), o quelle tumorali o che si localizzano su superfici sottoposte a carico e forze di trazione.

Le principali complicanze degli innesti sono legate alla formazione di raccolte sierose o ematiche, con conseguente necrosi dell’innesto, o ad una sua inadeguata immobilizzazione che porta, specie in zone articolari, a difetti di ancoraggio e mancato attecchimento. Tali inconvenienti, così come il rischio di

infezione, sono frequenti sia per gli innesti ampi sia per gli innesto spessi, che vanno pertanto controllati precocemente e accuratamente medicati.

Oggi trovano anche largo impiego i sostituti cutanei bioingegnerizzati, i quali hanno risolto problemi legati alla disponibilità di donatori, grazie ad essi partendo da un'area di 2 cm² di cute è possibile ottenere in breve periodo una superficie tale da rivestire gran parte del corpo di un uomo. I sostituti cutanei non hanno inoltre le problematiche immunologiche poiché le colture vengono create con cheratinociti autologhi⁵⁹. Nonostante ciò, questo tipo di innesti ricoprono un ruolo principalmente nel fornire una copertura transitoria e nello stimolare i fattori di crescita necessari per la guarigione di una lesione; non sono in grado di sostituire i tradizionali innesti autologhi a causa di varie difficoltà tra le quali: la ridotta vascolarizzazione, la fibrosi ai margini dell'innesto ingegnerizzato, la mancanza degli annessi cutanei, la lentezza di crescita cellulare nelle colture in vitro, le scarse risorse di cellule staminali, le proprietà meccaniche ed i costi⁶⁰. Per quanto riguarda le modalità di realizzazione dei sostituti cutanei essi si possono ottenere tramite colture in vitro, come la coltura cellulare su supporti di materiali biocompatibili oppure in vivo impiantando i surrogati tissutali direttamente sul paziente. Le cellule staminali epidermiche da coltivare si prelevano direttamente dai follicoli dei capelli eliminando la necessità di eseguire una biopsia, inoltre vi è anche la possibilità di conservare sia i cheratinociti che il tessuto coltivato attraverso la crio-conservazione.

1.4 INNESTO EPIDERMICO FRAZIONALE

L'innesto cutaneo epidermico ha avuto finora un uso limitato nella pratica clinica per la mancanza di una metodologia affidabile e automatizzata di prelievo dell'epidermide dal paziente. Il sistema utilizzato è uno strumento minimamente invasivo, automatizzato, utilizzabile in ambulatorio, per il prelievo di microcalotte epidermiche⁶¹ (Figura 2). Questo strumento è costituito da un'unità di controllo, da un manipolo e da un'unità monouso, che fornisce la struttura per la formazione delle microcalotte. Le indicazioni per questo tipo di innesto sono le ferite acute, ulcere croniche tipiche e atipiche, le ustioni e la vitiligine stabile da almeno 12 mesi⁶². Per la procedura sono necessari un sito donatore e un sito ricevente, come sito donatore è stato stabilito l'interno coscia, per una migliore aderenza del manipolo e un minore problema di gestione della ferita. Prima dell'applicazione del manipolo e dell'unità monouso è necessario detergere la zona donatrice con soluzione fisiologica ed, eventualmente, sottoporla a tricotomia. Il meccanismo d'azione è eseguito dall'unità di controllo, la quale determina una pressione negativa (400-500 mmhg) e un riscaldamento (37-41 Gradi) necessari per il sollevamento delle calotte epidermiche. Il manipolo eroga la pressione negativa e il riscaldamento al sistema di prelievo monouso e quindi anche all'area donatrice. La durata del prelievo dal sito donatore varia dai 30 ai 40 minuti e non necessita di anestesia dal momento che è rimosso solamente lo strato epidermico e di conseguenza, il sanguinamento, le cicatrici e il dolore sono minimi o assenti⁶³. Il sito donatore riepitelizza in pochi giorni e in massimo 4 settimane la zona è indistinguibile dalla cute sana.

Le microcalotte possono essere raccolte in microinnesti grazie ad una pellicola (ad es. Tegaderm. ®) o a una garza non aderente (ad es. Adaptic ®), che forniscono una spaziatura costante delle stesse e un corretto orientamento dell'innesto, per essere poi trasferite al sito ricevente. Per il successo degli innesti cutanei epidermici, come per il trattamento standard di tutte le ferite, è necessaria un'adeguata vascolarizzazione, il controllo della carica batterica e dello stato nutrizionale e l'individuazione della patologia di base della lesione ulcerativa, poiché la scelta del letto ricevente e la preparazione del letto della ferita sono fondamentali per il successo dell'innesto.



Figura 2: Strumento per innesti epidermici frazionali e sue componenti

2. MATERIALI E METODI

2.1 INNESTI NEL PIODERMA GANGRENOSO: ESPERIENZA DELLA U.O DERMATOLOGIA DELL'UNIVERSITÀ DI PISA

Presso la U.O. Dermatologia dell'Università di Pisa abbiamo trattato 25 pazienti (21 donne e 4 uomini) con diagnosi clinica ed istologica di Pioderma Gangrenoso .

L'età media al tempo della diagnosi era di 68,36 anni con un range di 22-93 anni.

La storia clinica di tutti i pazienti è stata documentata, inclusi i dettagli del trattamento iniziale e di tutti i successivi interventi. I pazienti presentavano vari tipi di comorbidità : Artrite Reumatoide (n=6), Malattia di Crohn (n=2), neoplasie(=3), due dei quali al colon e uno alla mammella, cirrosi biliare primitiva (n=1), LES (n=1), Polimialgia Reumatica (n=1) e Diabete Mellito (n=3). Per quanto riguarda la sede delle lesioni la maggior parte si localizzavano a livello degli arti inferiori, uno a livello peristomale, uno a livello della mammella degli arti e del dorso. La gestione terapeutica delle ulcere prevedeva l'utilizzo della terapia sistemica standard, e della gestione locale con medicazioni avanzate e bendaggi compressivi.

Tra questi pazienti, dieci, presentavano le caratteristiche idonee al trattamento con innesto cutaneo (Tabella 6). In otto di questi pazienti è stato effettuato un innesto di tipo omologo, gli altri due sono stati rispettivamente trattati con innesto autologo a spessore parziale e innesto autologo epidermico frazionale (CelluTomeTM).

Tabella 6. Caratteristiche e comorbidità nei pazienti sottoposti ad innesto.

Caso	Sesso	Età	Sede	Comorbidità	Terapia immunosoppressiva
1	M	62	Arto inferiore	Morbo di Crohn Epatopatia (steatosi)	si
2	F	73	Arto inferiore	Artrite Reumatode	si
3	F	76	Arto inferiore	etp colon	no
4	F	78	Arto inferiore	no	si
5	M	79	Arto inferiore	DM Artrite Reumatoide	Si
6	F	78	Arto inferiore	Epatite da HAV Bronchite cronica	No
7	F	73	Arto inferiore	Etp colon	No
8	F	76	Arto inferiore	Artrite Reumatoide	Si
9	F	68	Arto	Artrite	si (Adalimumab)

			inferiore	reumatoide	
10	M	84	Arto inferiore	no	No

Cinque di questi pazienti erano in trattamento con corticosteroidi sistemici, una paziente con Adalimumab e tutti con medicazioni avanzate e bendaggi.

Le lesioni avevano un' area compresa tra 24-134 cm², misurata attraverso Silhouette, un software che permette, a partire da un'immagine digitale, di misurare gli assi, il perimetro, la profondità e l'area dell' ulcera valutata. Le ulcere, risultavano inoltre stabili da almeno 1 mese nonostante il trattamento con terapie standard , e proprio per la mancata guarigione e per il buon letto della ferita abbiamo deciso di effettuare l' innesto.

Tabella 7: Area lesioni rilevata tramite Silhouette.

Paziente	Area della lesione
1	24.7 cm ²
2	24 cm ²
3	26,4 cm ²
4	14,98 cm ²
5	28,1 cm ²
6	61 cm ²
7	134 cm ²
8	64,1 cm ²
9	22,5 cm ²
10	110 cm ²

Di ciascuna lesione è stato valutato il Wound Bed Score [WBS] di Falanga del 2006⁶⁴ (Tabella 8), che analizza le caratteristiche del letto di ferita e della cute perilesionale .

Tabella 8 . Wound Bed Score

Caratteristiche	0	1	2
Guarigione dei bordi	no	25-75%	>75%
Escara	>25%	0-25%	no
Profondità ulcera/Tessuto di granulazione	Molto depresso o in rilievo rispetto alla cute perilesionale	Moderato	Arrossamento
Essudazione	Severa	Moderata	Mminima/Assente
Edema	Severo	Moderato	Minimo/Assente
Dermatite perilesionale	Severa	Moderata	Minima/Assente
Callo/Fibrosi perilesionale	Severo	Moderato	Minima/Assente
Arrossamento letto ferita	no	50-75%	>75%

Il Pioderma Gangrenoso è caratterizzato da un forte dolore e l'obiettivo dell'innesto, oltre a quello della guarigione e anche quello di ridurre la sintomatologia dolorosa. Abbiamo misurato questo sintomo prima della procedura tramite la scala VAS (Tabella 9).

La scala VAS (scala visuo-analogica) è uno strumento di misurazione delle caratteristiche soggettive del dolore provato dal paziente (Figura 3).

La scala consiste in una striscia di carta di 10 cm che alle estremità presenta due "end points" che vengono definiti con "nessun dolore" ed il "peggior dolore che io possa immaginare", viene chiesto al paziente di segnare in un punto della scala il dolore così come viene percepito. L'intervallo tra i due estremi (end points) è segnato ogni centimetro e permette di attribuire un valore numerico al dolore riferito dal paziente.

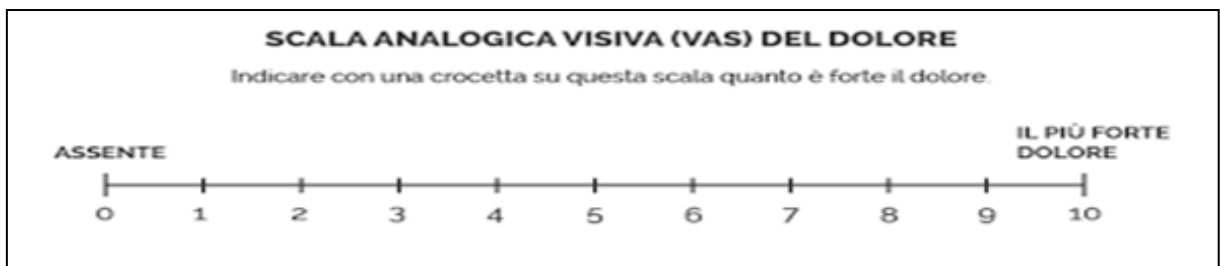


Figura 3: Scala VAS

Tabella 9 : Punteggio VAS riferito dai pazienti prima dell'innesto

caso	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
VAS	6	6	6	5	6	7	8	7	7	8

Per gli otto pazienti sottoposti ad innesto omologo abbiamo utilizzato DED (derma deepidermizzato) crioconservato a -80° , di 800 micron di spessore, proveniente dalla Banca della Cute di Siena.

Abbiamo aperto la confezione in condizioni di sterilità e lasciato il DED in soluzione fisiologica, per un tempo di 60 minuti prima dell'impiego (Figure 4 e 5).

In seguito abbiamo applicato la tecnica del Mesh-graft per rendere il tessuto adatto a ricoprire tutta l'area della lesione e per favorire il passaggio degli essudati (Figura 6).

Questa tecnica consiste nell' espansione a rete dell'innesto ottenuta distendendo il tessuto su un supporto e passandolo attraverso un apposito strumento chiamato Mesher (Figura 7).

Abbiamo effettuato disinfezione con Betadine soluzione, effettuato debridement chirurgico con curettage , per preparare al meglio il letto di ferita all'innesto.

Abbiamo applicato l'innesto e l' abbiamo fissato con steri-strip e coperto con medicazione assorbente e di captazione ed effettuato bendaggio adesivo elastico a due strati (Figura 8).



Figura 4 : tavolo operatorio



Figura 5: innesto in soluzione fisiologica

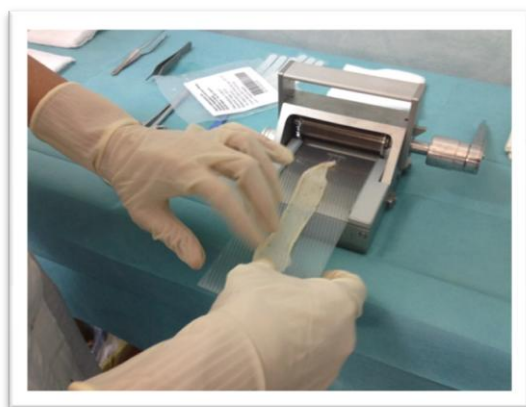


Figura 6 : posizionamento dell'innesto sul Mesher

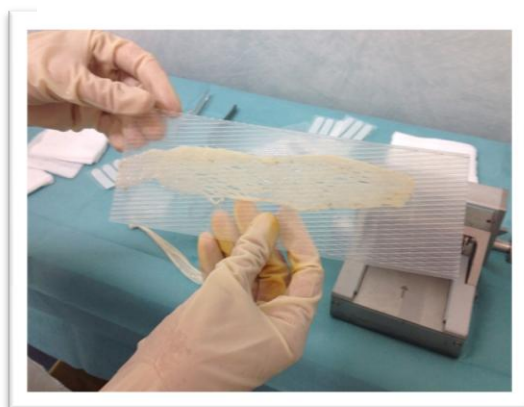


Figura 7 : innesto espanso a rete



Figura 8 : innesto fissato tramite steri-strip

Sempre presso la nostra Unità Operativa una paziente è stata trattata con innesto autologo a spessore parziale, mentre un'altra con innesto epidermico autologo frazionale tramite sistema CelluTome™.

In quest'ultimo caso abbiamo deterso con soluzione fisiologica e tricotomizzato la zona donatrice (l'interno coscia) e applicato il manipolo con l'unità monouso. Dopo 30-40 minuti, anche grazie a un'osservazione visiva delle microcalotte, abbiamo terminato il prelievo.

Le microcalote sono state raccolte in microinnesti grazie a una garza non aderente (Adaptic®) che fornisce una spaziatura costante delle stesse e un corretto orientamento dell'innesto, poi trasferite al sito ricevente e coperte da un cerotto con garza o a un bendaggio adeguato al tipo di lesione (Figura 9).

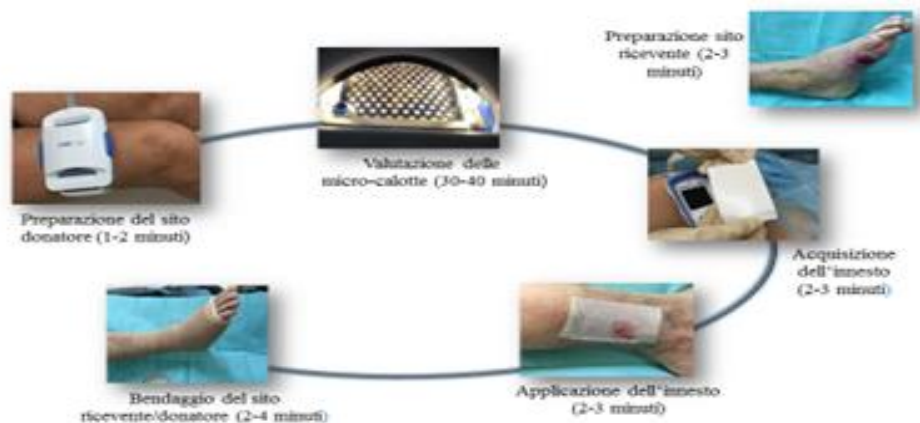


Figura 9: Procedura innesto epidermico frazionale

Nel caso della paziente trattata con innesto autologo abbiamo deterso con soluzione fisiologica la zona donatrice a livello dell'interno coscia, abbiamo ottenuto, tramite l'utilizzo di un dermatomo precalibrato, un innesto autologo a spessore parziale, lo abbiamo applicato a livello dell'ulcera da trattare e lo abbiamo fissato tramite dei punti metallici, abbiamo medicato con medicazione assorbente di captazione e bendaggio. La zona donatrice è stata trattata con garza non aderente e cerotto con tampone.

3 DISCUSSIONE

Presso la U.O. Dermatologia dell'Università di Pisa abbiamo effettuato 10 innesti cutanei in pazienti con Pioderma Gangrenoso, cinque di questi erano in trattamento con corticosteroidi sistemici ed uno con Adalimumab, tutti con medicazioni avanzate e bendaggi. Le dimensioni delle ulcere erano comprese in un range di 134 cm² e 14,98 cm², e si presentavano con un adeguato letto di ferita, assenza di infezione ed essudato minimo. Tutte le ulcere erano state trattate precedentemente con terapia locale standard: medicazioni in ambiente umido e bendaggi.

Di ciascun paziente abbiamo preso in esame tre elementi, seguendone l'evoluzione prima e dopo l'innesto, questi elementi sono:

- Area della lesione (Tabella 10)
- WBS (Tabella 11)
- Dolore misurato tramite Scala VAS (Tabella 12)

Abbiamo posto attenzione al tipo di terapia assunta dal paziente, in particolare alla terapia immunosoppressiva a base di corticosteroidi sistemici e farmaci biologici.

Tabella 10: Area di partenza e a due mesi dall'innesto

caso	Aresa iniziale	Aresa dopo l'innesto	Terapia immunosoppressiva
1	24,7 cm ²	4,4 cm ²	si
2	24 cm ²	14,8 cm ²	si
3	26,4 cm ²	12,2 cm ²	no
4	14,98 cm ²	8,42 cm ²	si
5	28,1 cm ²	guarigione	si
6	61 cm ²	4,8 cm ²	no
7	134 cm ²	89 cm ²	no
8	64,1 cm ²	guarigione	si
9	22,5 cm ²	2,2 cm ²	si
10*	110 cm ²	85 cm ²	no

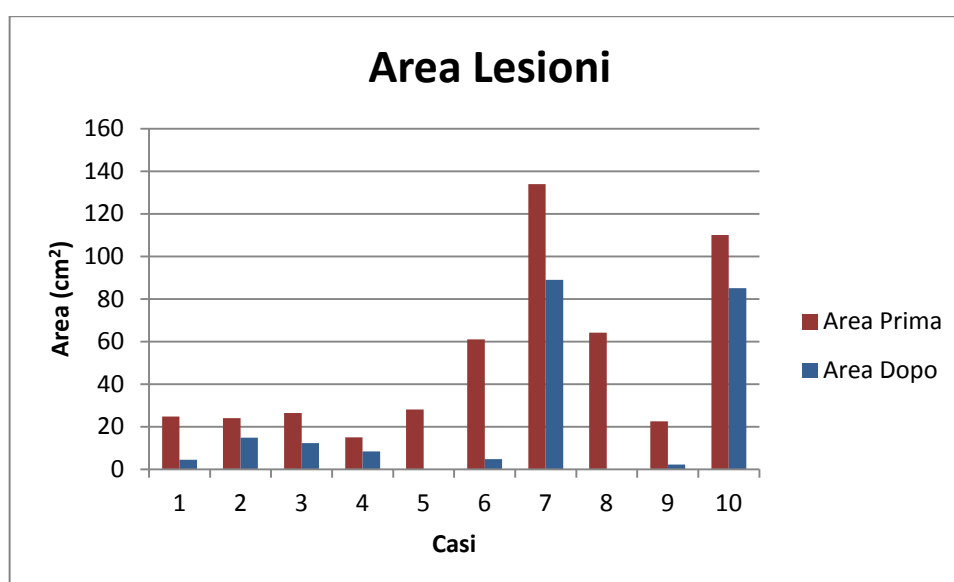







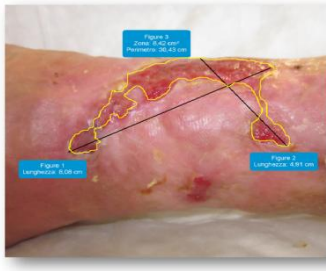










Figura 10: Area delle lesioni rilevate prima e dopo il trattamento.

Tabella 11: WBS di partenza e due mesi dall'innesto

Caso	Ulcera iniziale	WBS	Ulcera dopo innesto	WBS
1		13		14
2		14		15
3		14		15
4		14		15

5		14		16
6		13		15
7		14		15
8		14		16



9		13		15
10*		14		15



Figura 11: Andamento WBS nei casi analizzati.

Tabella 12: Valutazione del dolore tramite scala VAS

Caso	Vas iniziale	Vas dopo due mesi
1	6	3
2	6	4
3	6	4
4	5	4
5	6	0
6	7	3
7	8	7
8	7	0
9	7	3
10*	8	6

*Il caso 10 è stato osservato per un periodo di due settimane.

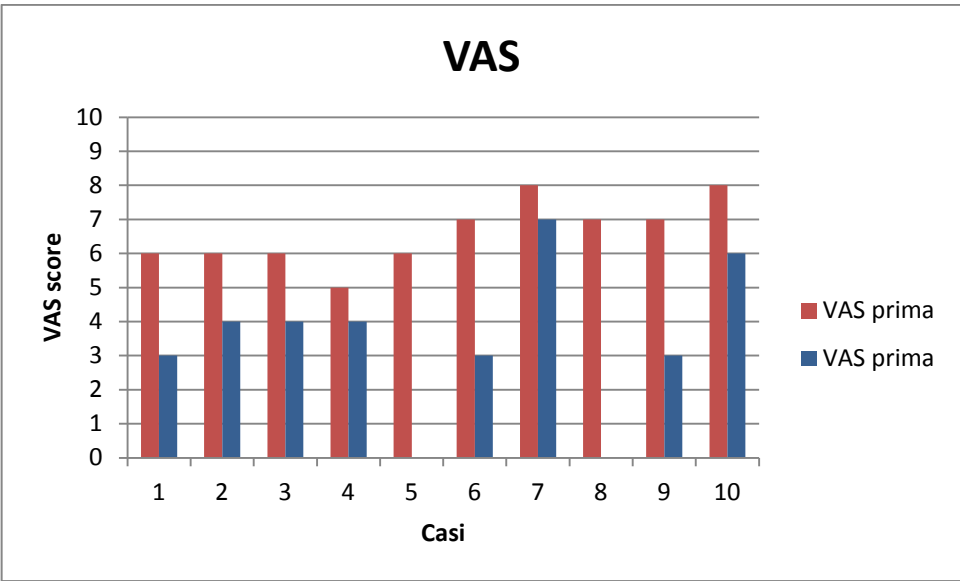


Figura 12: Andamento del parametro VAS nei casi analizzati.

In due mesi abbiamo osservato la guarigione di 2 ulcere su 10 (20%) ed una riduzione dell'area di 8 su 10 (80%). Nel paziente osservato per due settimane abbiamo visto una riduzione dell'area di 25 cm², un miglioramento del WBS, da un punteggio di 14 siamo arrivati a 15 ed, inoltre, abbiamo ottenuto una buona riduzione della sintomatologia dolorosa. L'area di partenza delle ulcere prima degli innesti era compresa in un range di 134-14,98 cm² con una media di 50,97 cm², dopo due mesi dall'innesto i valori erano compresi tra 89 e 0 cm² con una media di 22,08 cm².

Abbiamo quindi ottenuto una riduzione di 28,9 cm² complessivi. Prendendo in considerazione la terapia medica abbiamo notato che nei pazienti in trattamento immunosoppressivo l'area media delle lesioni, dopo due mesi dall'innesto cutaneo, ha raggiunto il valore di 4,97 cm², partendo da un valore medio di 29,73 cm², in questo gruppo di pazienti rientrano i due casi di guarigione, negli altri pazienti, partendo da un valore medio di 82,85 cm² siamo arrivati a 47,75 cm².

L'area donatrice è guarita in un massimo di due settimane senza esiti cicatriziali nel caso dell'innesto epidermico frazionale, mentre ha lasciato esiti iperpigmentati nel caso dell'innesto autologo a spessore parziale.

Il WBS è migliorato nella stessa frazione di tempo in 10 ulcere su 10 (100%) partendo da un valore medio di 13,7 ha raggiunto i 15,1.

Siamo andati a rivalutare il dolore nei pazienti due mesi dopo l'innesto e abbiamo riscontrato una riduzione di 3,2 punti del valore medio della scala Vas anche nei pazienti nei quali non abbiamo ottenuto una riduzione rilevante dell'area dell'ulcera.

4 CONCLUSIONI

Il Pioderma Gangrenoso è una rara dermatosi infiammatoria neutrofilica ad eziologia sconosciuta, colpisce prevalentemente una fascia di età compresa tra i 20 e i 50 anni con una netta prevalenza di donne affette rispetto agli uomini. Questa patologia ha un importante impatto sulla qualità di vita a causa del dolore, del cattivo odore e dell'essudato caratteristici delle lesioni, che possono provocare stati depressivi ed isolamento sociale. Sebbene una percentuale variabile di casi di piodermi gangrenosi sia idiopatico, quasi la metà si associano ad altre patologie, tra le più frequenti troviamo le IBD, le malattie reumatologiche e le neoplasie.

L'approccio terapeutico a questa patologia è talvolta complesso per cui risulta opportuno prendere in considerazione l'utilizzo sia di tecniche standard che di tecniche alternative, di tipo medico e chirurgico.

Nella nostra esperienza di trattamento chirurgico dei piodermi gangrenosi abbiamo utilizzato tre tipi differenti di innesti : innesto autologo, innesto epidermico frazionale con metodo CelluTome™ ed innesto omologo , tra questi l'innesto autologo rappresenta una procedura standard nel trattamento delle ferite di difficile trattamento ma risulta più invasivo rispetto agli altri due tipi di innesto utilizzati e può essere eseguito solo in uno stato non attivo di malattia. Abbiamo visto un buon risultato clinico con un netto miglioramento di gran parte delle ulcere trattate in due mesi e una buona risposta anche nel caso seguito per due settimane. La maggior parte delle ulcere trattate con innesto omologo e innesto epidermico frazionale dimostravano una stimolazione della riepitelizzazione del bordo della ferita e una maggior formazione di tessuto di

granulazione. Nel caso trattato con innesto epidemico frazionale tramite CelluTome™ non sono state osservate cicatrici o alterazioni della pigmentazione a livello del sito donatore che è guarito completamente dopo 14 giorni e non ha richiesto ulteriori cure, nel caso dell'innesto autologo sono stati osservati esiti iperpigmentati. L'innesto omologo e l'innesto epidermico frazionale hanno richiesto circa 50 minuti, circa un'ora l'innesto autologo.

L'utilizzo degli innesti cutanei autologhi, omologhi ed epidermici frazionali ha portato alla riduzione dell'area della lesione, ad un miglioramento del WBS e , ha portato ad una riduzione della sintomatologia dolorosa. Anche nei pazienti nei quali non si è ottenuta una guarigione o una riduzione cospicua dell'area della lesione, abbiamo osservato una riduzione del dolore e, di conseguenza, un miglioramento della qualità di vita a sottolineare l'importanza degli innesti nella cura di questo sintomo.

In conclusione possiamo affermare che gli innesti cutanei possono fornire una buona alternativa per gestire i piodermi gangrenosi che presentano difficoltà a guarire in associazione ad altre terapie standard locali e sistemiche.

BIBLIOGRAFIA

¹ Jan Robert Mekkes :Treatment of pyoderma gangrenosum.BMJ 2015 Jun 12 ; 350:h 3175

² Ana Gameiro, Neide Pereira , José Carlos Cardoso :Pyoderma gangrenosum :challenges and solutions.Clin Cosmet Investig dermatol 2015 May 28, 8:285-93

³ SM.Langan, RW.Groves, TR.Card : Incidence,mortality,and disease associations of pyoderma gangrenosum in the UK :a retrospective cohort study.J Invest Dermatol 2012 Sep;132(9):2166-70

⁴ Bath RM. Pyoderma gangrenosum: An update. Indian Dermatol on line J. 201 Jan-Apr; 3(1):7-13.

⁵ Fulbright RK, Wolf JE, Tschen JA: Pyoderma gangrenosum at surgery sites. J Dermatol Surg Oncol 1985,11:883-6.

⁶ K Wolska, M Michalska-Jakubus, J Pacula et al.: Bullous Pyoderma Gangrenosum associated with pancytopenia of unknown origin.Postepy Dermatol Alergol 2014Aug;31(4):272-6.

⁷ Forum Patel, Sarah Fitzmaurice, Cristopher Duong et al.:Effective Strategies For the management of Pyoderma Gangrenosum :a comprehensive review. Acta derm Venereol 2015 May;95(5):525-31.

⁸ M.P Karampetsou, S.N.C Liossis, P.P. Sfikakis :TNF-alfa antagonist beyond approved indications :stories of success and prospects for the future.QJM 2010 Dec;103(12):917-28.

⁹ A.V.Marazano, M.Cugno, V. Trevisan et al.: Role of inflammatory cells,cytokines and matrix metalloproteinases in neutrophil-medated skin diseases.Clin Exp Immunol 2010 Oct; 162(1) : 100-7.

-
- ¹⁰ Shintaro Sagami, Yoshitaka Ueno, Shinji Tanaka et al.:Successful use of Adalimumab for treating Pyoderma Gangrenosum with Ulcerative Colitis under Coricosteroid tapering conditions. Intern Med 2015;54(17):2167-72.
- ¹¹ Oka M,Berking C,Nesbit M,SatyamoorthyK:Interleukin 8 overexpression is present in pyoderma gangrenosum ulcers and leads to ulcer formation in human skin xenografts.Lab Invest 2000; 80:595-604.
- ¹²Mittal S,Milner BJ,Vickers MA:Pyoderma Gangrenosum as a cause of splenomegaly and association with a T cell clone.Clin Lab Haematol 2005;27:402-404
- ¹³ Brooklyn TN,Williams AM,Dunnill MG:T cell receptor repertoire in Pyoderma Gangrenosum:evidence for clonal expansions and trafficking.Br J Dermatol 2007,157:960-966
- ¹⁴ Gangaram HB, Tan LP, Gan AT et al.: Pyoderma gangrenosum following treatment with isotretinoin . Br J Dermatol 1997; 136:636-7.
- ¹⁵ Srebrnik A, Shachar E, Brenner S.: Suspected induction of pyoderma gangrenosum-like eruption due to sulpiride treatment. Cutis 2001; 67: 253-6.
- ¹⁶ Sedda S ,Caruso R,Marafini I et al :Pyoderma gangrenosum in refractory celiac disease : a case report. BMC Gastroenterology 2013, 13:162
- ¹⁷ Sharareh Ahmadi and Frank C. Powell: Pyoderma gangrenosum: uncommon presentations Cl Dermatol 2005;23(6):612-20 .
- ¹⁸ Newman WD and Frank HJ: Pyoderma gangrenosum of the orbit, Eye 1993; 7: 89–94.

-
- ¹⁹ *Callen P and Woo TY*: Vesiculopustular eruption in a patient with ulcerative colitis, *Arch Dermatol* 1985; 121:399.
- ²⁰ *Perry HO, Winkelmann RK*: Bullous pyoderma gangrenosum and leukaemia. *Arch Dermatol* 1972; 106: 901–5.
- ²¹ *Lachapelle JM, Marot L, Jablonska S*: Superficial granulomatous pyoderma gangrenosum of the face, successfully treated by cyclosporine: a long term follow-up, *Dermatology* 2001; 202: 155–7.
- ²² *Marwan M.azae, Ryan F.Rellich, Bryan H.Schmitt*. Cutaneous Blastomycosis Masquerading as a Pyoderma Gangrenosum. *Journal of Clinical Microbiology* p.1298-1300.
- ²³ *Su WPD, Duncan SC, Perry HO*: Blastomycosis-like pyoderma, *Arch Dermatol* 1979; 115:170–3.
- ²⁴ *DeClerck B, Jhun P, Bright A* :Pyoderma gangrenosum :an inside job. *Ann Emerg Med*.2015;66:116-118.
- ²⁵ *JR Thornton, RH Teague, TS Low-Beer*. Pyoderma gangrenosum and ulcerative colitis. *Gut*,1980,21,247-248.
- ²⁶ *Watts JM, De Dombal FT, Golinger JC*. Long term complications and prognosis following major surgery for ulcerative colitis. *Br J Surg* ,1966; 53: 1014-23.
- ²⁷ *Weenig RH, Bruce AJ, McEvoy MT, et al*:Neutrophilic dermatosis of the hand :four cases and review of the literature.*Int J Dermatol* 2004, 43:95-102
- ²⁸ *DeFilippis EM, Feldman SR and Huang WW*:The genetics of pyoderma gangrenosum and implications for treatment : a systematic review.*British Journal of Dermatology* (2015) 172,pp 1487-1497.

-
- ²⁹ Wagner AD, Andersen J, Jendro MC, Hulsemann JL. Sustained response to tumor necrosis factor alpha-blocking agents in two patients with SAPHO. *Arthritis Rheum* 2002;19:65-8.
- ³⁰ Kratzsch D, Ziemer M, Milkova L. Facial Pyoderma Gangrenosum in senescence. *Case Rep Dermatol* 2013;5:295-300.
- ³¹ Al Ghazal P, Herberger K, Schaller J. Associated factors and comorbidities in patients with Pyoderma gangrenosum in Germany: a retrospective multicentric analysis in 259 patients. *Orphanet J rare dis.* 2013;8 :136.
- ³² Bakelants E, Van der Hilst J, Corluy L. The diagnosis tangle of Pyoderma Gangrenosum : a case report and review of the literature. *Neth J Med* 2014 Dec;72(10):541-4.
- ³³ Weening RH, Davis MD, Dahl PR. skin ulcers misdiagnosed as pyoderma gangrenosum. *N Engl Med* 2002 347:1412-1418.
- ³⁴ Savoia F, Gaddoni G, Patrizi A. Calcifilassi in pazienti dializzati, una malattia grave poco rispondente alle terapie: report di 4 casi clinici. *Giornale Italiano di Dermatologia e Venereologia* 2013;148(5):531-6.
- ³⁵ Smith GL, Bunker CB, Dineen MD. Fournier's gangrene. *Br J Urol.* 1988; 81:347-55.
- ³⁶ Solovan C, Smiszek R, Wickenhauser C. Postoperative Pyoderma Gangrenosum in association with Renal Cell Carcinoma and Chronic Lymphocytic Leukemia. *Infect Dis Ther* (2013) 2 ;75-80.
- ³⁷ I. Ferkolj, A. Hocevar, R. Golouh. Infliximab for treatment of resistant pyoderma gangrenosum associated with Crohn's disease. *Acta Dermatoven APA* Vol 15, 2006, No4.

-
- ³⁸ Maini RN, Breedveld FC, Kalden JR *et al.* Therapeutic efficacy of multiple intravenous infusions of anti-tumor necrosis factor (α) monoclonal antibody combined with low dose weekly methotrexate in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1998; 41: 1552-1563.
- ³⁹ Margaret A. Fonder, Deborah L. Cumminis, Benjamin D.Ehst. Adalimumab therapy for recalcitrant Pyoderma gangrenosum. Correspondence :jon.meyerle hmi.edu November 20,2006.
- ⁴⁰ Mosti.G.Wound care in venous ulcers. *Phlebology.* 2013 Mar;28 Suppl 1:79-85.
- ⁴¹ Halim AS, Khoo TL, Saad AZ.Indian J Plast Surg. Wound bed preparation from a clinical perspective.2012 May;45(2):193-202
- ⁴² Fletcher J Wound bed preparation and the TIME principles..*Nurs Stand.* 2005 Nov 30-Dec 6;20(12):57-65
- ⁴³ Stojadinovic A, Carlson JW, Schultz GS, Davis TA, Elster EA.Topical advances in wound care.*Gynecol Oncol.* 2008 Nov ;111(2 Suppl):S70-80
- ⁴⁴ Carville K.Which dressing should I use? It all depends on the 'TIMEING'.*Aust Fam Physician.* 2006 Jul;35(7):486-9.
- ⁴⁵ Falabella AF.Debridement and wound bed preparation.*Dermatol Ther.* 2006 Nov-Dec;19(6):317-25
- ⁴⁶ Douglass J Wound bed preparation: a systematic approach to chronic wounds.*Br J Community Nurs.* 2003 Jun;8(6 Suppl):S26-34
- ⁴⁷ Dowsett C, Ayello E.TIME principles ofchronic wound bed preparation and treatment.*Br J Nurs.* 2004 Aug 12-Sep 8;13(15):S16-2
- ⁴⁸ Ligresti C, Bo F.Wound bed preparation of difficult wounds: an evolution of the principles of TIME. *Int Wound J.* 2007 Mar; 4(1):21-9.

-
- ⁴⁹ Falanga V. Wound bed preparation and the role of enzymes: a case for multiple actions of therapeutic agents. *Wounds: A compendium of clinical Research and Practice*;14(2):2002
- ⁵⁰ Stephenson AJ, Griffiths RW, La Hausse-Brown TP. Patterns of contraction in human full thickness skin grafts. *Br J Plast Surg.* 2000;53:397–402.
- ⁵¹ Andreassi A, Bilenchi B, Biagioli M et al. Classification and pathophysiology of skin graft. *Clin Dermatol* 2005;23
- ⁵² Jones JE, Nelson EA, Al-Hity A. Skin grafting for venous leg ulcers. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013 Jan 31;1:
- ⁵³ Audrain H, Bray A, De Berker D. Full-thickness skin grafts for lower leg defects: an effective repair option. *Dermatol Surg.* 2015 Apr;41(4):493-8.
- ⁵⁴ Prasetyono TO, Sadikin PM, Saputra DK. The use of split-thickness versus full-thickness skin graft to resurface volar aspect of pediatric burned hands: A systematic review. *Burns.* 2015 Feb 23. pii: S0305-4179(15)00012-1.
- ⁵⁵ CUONO C.B., LANGDON R., BIRCHALL N. Composite autologous-allogeneic skin replacement: development and clinical application. *Plast Reconstr Surg* 80, 626-637, 1987.
- ⁵⁶ CINAMON U., ELDAD A., CHAOUAT M: A simplified testing system to evaluate performance after transplantation of human skin preserved in glycerol or in liquid nitrogen. *J Burn Care Rehabil.* 14(4), 435-439, 1993

⁵⁷ Miller JD, Rankin TM, Hua NT.: Reduction of pain via platelet-rich plasma in split-thickness skin graft donor sites: a series of matched pairs. *Diabet Foot Ankle*. 2015 Jan 22;6:24972

58 AMOS DB, GORER PA, MIKULSKA BM. An antibody response to skin homografts in mice. Br J Exp Pathol. 1954 Apr;35(2):203-8

⁵⁹ Cai EZ, Teo EY, Jing L, Koh YP, Qian TS, Wen F, Lee JW, Hing EC, Yap YL, Lee H, Lee CN, Teoh SH, Lim J, Lim TC. Bio-conjugated polycaprolactone membranes: a novel wound dressing. *Arch Plast Surg*. 2014 Nov;41(6):638-46.

⁶⁰ Constantin MM, Poenaru E, Poenaru C, Constantin T. Skin Hydration Assessment through Modern Non-Invasive Bioengineering Technologies. *Maedica (Buchar)*. 2014 Mar;9(1):33-8.

⁶¹ Tam J, Wang Y, Farinelli WA. Fractional Skin Harvesting: Autologous Skin Grafting without Donor-site Morbidity. *Plast Reconstr Surg Glob Open*. 2013 Oct 7;1(6):e47.

⁶² Romanelli M, Dini V. Fractional epidermal skin grafting. *Br J Dermatol*. 2015 Apr;172(4):853-4

⁶³ Purchke M. et al. Novel methods for generating fractional epidermal micrografts. *Br J Dermatol*. 2015. April. 172 (4):1021-8.

⁶⁴ Falanga V¹, Saap LJ, Ozonoff A. Wound bed score and its correlation with healing of chronic wounds. *Dermatol Ther*. 2006 Nov-Dec;19(6):383-90.